

**INTERACTIONS OF
HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS AND APOLIPOPROTEIN A-I
WITH AORTIC ENDOTHELIAL CELLS**

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
Pascale Michèle Ohnsorg
Dipl. Natw. ETH
born on February 14th, 1980
citizen of Zurich, ZH

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Markus Stoffel, examiner
Prof. Dr. Kaspar Locher, co-examiner
Prof. Dr. Arnold von Eckardstein, co-examiner
Dr. Lucia Rohrer, co-examiner

Summary

Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease and still the major cause of death worldwide. It is characterized by the accumulation of cholesterol-loaded macrophages in the arterial wall which induces a thickening of the vessel wall and can lead to plaque formation. Acute cardiovascular events (e.g. myocardial infarction and stroke) are frequently caused by plaque rupture and resulting thrombosis.

High-density lipoproteins (HDL) are cholesterol carriers in the plasma and their major protein constituent is apolipoprotein A-I (apoA-I). Based on many epidemiological and experimental findings HDL and apoA-I are considered as antiatherogenic molecules and therefore attractive targets for prevention and therapy of coronary heart disease. Some of their diverse atheroprotective properties are exerted within the arterial wall and therefore HDL and apoA-I must leave the circulation and pass the endothelium. However, until now it is little understood how HDL and apoA-I leave the plasma compartment and pass the endothelial barrier to reach this extravascular space. We have recently reported that aortic endothelial cells bind, internalize, and translocate lipid-free apoA-I from the apical to the basolateral compartment in a specific and temperature dependent manner. Furthermore, we showed that this transendothelial transport of apoA-I involves ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 and that after specific transport, the originally lipid-free apoA-I molecules were recovered as lipidated particles.

In this thesis we first analyzed the interaction of mature HDL with endothelial cells. We found that aortic endothelial cells bind, internalize, and translocate HDL from the apical to the basolateral side in a specific and temperature-dependent manner without degrading the protein moiety and that this transendothelial transport of HDL is modulated by the proteins ABCG1 and the scavenger receptor BI (SR-BI).

We also further characterized the transendothelial transport of apoA-I to provide more evidence for the specificity and to unravel the mechanism. We hypothesized that apoA-I transport is started by the ABCA1-mediated generation of a lipidated particle which is then transported by ABCA1-independent pathways. To test this hypothesis, we analyzed the endothelial binding and transport properties of initially lipid-free as well as pre-lipidated apoA-I mutants. Our data showed that the carboxy-terminal domain of apoA-I is mandatory for the transendothelial transport of lipid-free apoA-I but not of pre-lipidated

apoA-I particles and thus support the model of a two-step process for transendothelial apoA-I transport in which apoA-I is initially lipidated by ABCA1 and then further processed by ABCA1-independent mechanisms. However, the amphipathic midregional alpha helices of apoA-I provide the basis for unspecific interactions with the lipid-bilayer of the plasma membrane. By microscopy studies we demonstrated that the transendothelial apoA-I transport is a vesicular transport which most likely starts with the endocytosis of apoA-I into the early endosomes of endothelial cells.

In addition, we analyzed the behaviour of another apoA-I variant, a trimeric high molecular weight variant of apoA-I (TripA), which has been engineered as a potentially antiatherogenic therapeutic. The trimerization should counteract the otherwise fast renal filtration of apoA-I when infused into patients. We here investigated whether this TripA mimicks important properties of apoA-I in lipoprotein metabolism, namely formation of HDL-like particles, stimulation of cholesterol efflux from macrophages, activation of the cholesterol esterifying enzyme LCAT, and transendothelial transport. Our data demonstrated that TripA, whether lipid-free or lipidated, showed similar in vitro properties like apoA-I and HDL, respectively.

Finally, we demonstrated that on the surface of endothelial cells F_0F_1 ATPase hydrolyzes ATP upon binding of apoA-I. The ADP thereby produced stimulates internalization and transendothelial transport of apoA-I and probably also HDL. Simultaneous siRNA inhibition of ABCA1 expression and pharmacological inhibition of the F_0F_1 ATPase did not reveal any additive effect suggesting that ABCA1 and F_0F_1 ATPase act in series rather than in parallel.

To conclude, our data suggest that transendothelial apoA-I transport is vesicular and involves as a first step the lipidation of the molecule by ABCA1. Subsequently, the thereby generated particle is transported via ABCA1-independent pathways. This mechanism is most likely shared with the transendothelial transport of HDL where ABCG1 and SR-BI are involved. F_0F_1 ATPase stimulates internalization and transport of apoA-I and HDL via as yet unknown downstream mechanisms.

Zusammenfassung

Arteriosklerose ist eine chronische, entzündliche Gefässerkrankung und immer noch die häufigste Todesursache weltweit. Charakteristisch für diese Erkrankung ist die vermehrte Einlagerung von Cholesterin-beladenen Makrophagen in den Gefässwänden, was zu einer Verdickung der Gefässwand und einer Plaquebildung führt. Akute Herz-Kreislauf-Vorfälle (z.B. Herzinfarkte und Schlaganfälle) werden gewöhnlich durch das Aufbrechen des Plaques mit resultierender Thrombose ausgelöst. High-density Lipoproteine (HDL) transportieren Cholesterin im Plasma und enthalten Apolipoprotein A-I (ApoA-I) als Hauptstrukturprotein. HDL und apoA-I werden, basierend auf vielen epidemiologischen und experimentellen Daten, als antiatherogene Moleküle betrachtet und sind darum attraktive Ziele für Prävention und Therapie der koronaren Herzerkrankung. Einige von ihren verschiedenen atheroprotektiven Eigenschaften üben sie in der Gefässwand aus, so dass HDL und ApoA-I den Kreislauf verlassen und das Endothel durchqueren müssen. Bis jetzt ist nur wenig bekannt wie HDL und ApoA-I das Plasma verlassen und die Endothelbarriere passieren, um in diesen extravaskulären Raum zu gelangen. Vor kurzem haben wir berichtet, dass Endothelzellen der Aorta lipidfreies ApoA-I binden, internalisieren und von der apikalen zur basolateralen Seite transportieren und zwar spezifisch und temperaturabhängig. Desweiteren haben wir gezeigt, dass in diesem transendothelialen ApoA-I-Transport der ATP-bindende Kassetten Transporter (ABC) A1 involviert ist und dass die ursprünglich lipidfreien ApoA-I Moleküle nach dem spezifischen Transport lipidisiert sind.

In dieser Arbeit analysierten zuerst wir die Interaktion von reifem HDL mit Endothelzellen. Wir haben gefunden, dass Endothelzellen der Aorta HDL binden, internalisieren und von der apikalen zur basolateralen Seite transportieren, und zwar spezifisch und temperaturabhängig und ohne dass die Proteinanteile abgebaut werden. Dieser transendotheliale HDL-Transport wird moduliert durch ABCG1 und den Scavenger-Rezeptor BI (SR-BI). Ausserdem haben wir den ApoA-I-Transport weiter charakterisiert, um mehr Anhaltspunkte für die Spezifität zu gewinnen und den Mechanismus aufzuklären. Unsere Hypothese besagt, dass der ApoA-I-Transport mit der ABCA1-vermittelten Bildung eines lipidierten Partikels beginnt, der dann durch ABCA1-unabhängige Mechanismen transportiert wird. Um diese Hypothese zu testen, analysierten wir die endothelialen Bindungs- und Transporteigenschaften von ursprünglich lipidfreien und von

vorher lipidierten ApoA-I-Mutanten. Unsere Daten erlauben den Schluss, dass die carboxy-terminale Domäne von ApoA-I zwingend erforderlich ist für den transendothelialen Transport von lipidfreiem ApoA-I, nicht aber für den Transport von lipidierten ApoA-I Partikeln. Dies unterstützt unser Modell von einem zwei-Stufen Prozess für den transendothelialen ApoA-I-Transport, bei dem ApoA-I zuerst von ABCA1 lipidiert wird und dann weiter durch ABCA1-unabhängige Mechanismen prozessiert wird. Die amphipathischen alpha Helices in der Mitte von ApoA-I sind die Grundlage für unspezifische Interaktionen mit der Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran. Durch Mikroskopie-Studien haben wir gezeigt, dass der ApoA-I-Transport ein vesikulärer Transport ist, der wahrscheinlich mit der Endozytose von ApoA-I in die frühen Endosomen von Endothelzellen beginnt. Zusätzlich analysierten wir das Verhalten einer anderen ApoA-I-Variante, einer trimeren hochmolekularen Variante von ApoA-I (TripA), die als potenzielles antiatherogenes Therapeutikum entwickelt wurde. Die Trimerisierung soll der schnellen Filtration des ApoA-I durch die Niere entgegenwirken, wenn es Patienten injiziert wird. Wir haben untersucht, ob dieses TripA dieselben wichtigen Eigenschaften wie ApoA-I im Lipoprotein-Metabolismus aufweist, wie die Bildung von HDLartigen Partikeln, die Stimulierung des Cholesterin-Efflux aus Makrophagen, die Aktivierung des Cholesterin-veresternden Enzyms LCAT und den transendothelialen Transport. Unsere Daten haben gezeigt, dass TripA, lipidfrei oder lipidert, ähnliche in vitro Eigenschaften wie ApoA-I und respektive HDL aufweist. Schlussendlich haben wir noch gezeigt, dass die F_0F_1 ATPase auf der Oberfläche von Endothelzellen nach der Bindung von ApoA-I ATP hydrolysiert. Das ADP, das dabei produziert wird, stimuliert die Internalisierung und den transendothelialen Transport von ApoA-I und wahrscheinlich auch von HDL. Gleichzeitige siRNA Hemmung der ABCA1-Expression und pharmakologische Hemmung der F_0F_1 ATPase zeigten keinen additiven Effekt, so dass ABCA1 und die F_0F_1 ATPase wahrscheinlich seriell arbeiten und nicht parallel.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass der transendotheliale ApoA-I-Transport vesikulär ist und als ersten Schritt eine Lipidierung des Moleküls durch ABCA1 beinhaltet. Danach wird der dabei gebildete Partikel durch einen ABCA1-unabhängigen Mechanismus transportiert. Dieser Mechanismus ist höchstwahrscheinlich derselbe wie für den transendothelialen HDL-Transport, bei dem ABCG1 und SR-BI involviert sind. Die F_0F_1 ATPase stimuliert die Internalisierung und den Transport von ApoA-I und HDL durch noch unbekannte nachgeordnete Mechanismen.